

硫酸盐还原菌类群分离培养和PCR分析鉴定

王明义^{1,2}, 梁小兵^{1*}, 郑娅萍², 魏中青¹, 赵由之¹

摘要: [目的] 探讨分离培养和聚合酶链反应(PCR)在硫酸盐还原菌类群分析鉴定中的应用。[方法] 采用分离培养和PCR对贵州阿哈湖沉积物中硫酸盐还原菌类群进行分析,并对分离纯化的一株硫酸盐还原菌进行鉴定。[结果] 贵州阿哈湖沉积物硫酸盐还原菌类群为脱硫肠菌属、脱硫叶菌属和脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属;纯化菌株经PCR扩增初步鉴定为脱硫叶菌属,菌株形态与鉴定结果相符。[结论] 采用分离培养结合PCR,可以对硫酸盐还原菌类群进行分析和鉴定。

关键词: 分离培养; 聚合酶链反应; 硫酸盐还原菌

Isolation Culture and PCR Identification of Sulfate-Reducing Bacteria Subgroups WANG Ming-yi^{1, 2}, LIANG Xiao-bing^{1*}, ZHENG Ya-ping², WEI Zhong-qing¹, ZHAO you-zhi¹ (1.State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry Chinese Academy of Science, Guizhou 550002, China; 2.Department of Biochemistry and Molecular Biology, Gui yang Medical College, Guizhou 550004, China)

Abstract: [Objective] To study the utilization of isolation culture and PCR in the identification of sulfate-reducing bacteria subgroups. [Methods] Isolation culture and PCR were performed to analyze sulfate-reducing bacteria subgroups in the sediment of Lake Aha in Guizhou Province and a purified strain identified from the sample. [Results] Desulfotomaculum, Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina and Desulfobulbus were detected in the sample. The purified strain was demonstrated preliminarily be Desulfobulbus and the morphologic characteristic of the strain is congruous with Desulfobulbus. [Conclusion] The analysis and identification of sulfate-reducing bacteria subgroups can be achieved by isolation culture and PCR.

Key Words: isolation culture; PCR; sulfate-reducing bacteria

硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)是一类严格厌氧菌,其在代谢活动中可以利用硫酸盐作为电子受体并产生高浓度H₂S。研究环境中硫酸盐还原菌类群和分子生物学特征变化,对认识全球和局部区域环境的硫循环规律、生态系统对酸雨的响应机制以及重金属等环境污染物迁移转化有着重要的理论意义和实际应用价^[1-3]。

硫酸盐还原菌类群分析鉴定方法主要有传统学分类^[4,5]和分子生物学分类^[6-8],各有不同的优缺点。我们利用分离培养和PCR扩增对贵州阿哈湖沉积物进行了硫酸盐还原菌类群分析,并将一株纯化的硫酸盐还原菌初步鉴定为脱硫叶菌属,菌株形态学特征也符合该类群。本文目的在于优化硫酸盐还原菌分离培养条件,探讨分离培养和PCR扩增对硫酸盐还原菌类

群分析和鉴定的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 硫酸盐还原菌培养基 乳酸2.5 ml, Na₂SO₄ 1.0 g, NH₄Cl 1.0 g, CaCl₂ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, 酵母膏 1.0 g, L-半胱氨酸 0.6 g, 0.1%刃天青 1 ml, FeSO₄ 2.5 g; 硫酸盐还原菌固体培养基加入2%琼脂。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA聚合酶、dNTP、DNA Marker和引物均为华美公司产品提供或合成,电泳用琼脂糖购于Shanghai Yito公司。

1.1.3 仪器 超净工作台(苏州安泰公司, SW-CJ-1F型); PCR梯度扩增仪(美国Bio-Rad公司); DNA定量仪(美国Beckman公司, 640型); 凝胶成像及分析系统(美国Bio-Rad公司, 75S02580型); Bbo3-A厌氧菌培养罐(北京百信生物技术有限公司); 氮气手套箱(美国Fisher公司); 沉积物-水界面采样装置为本研究所参考他人研究结果^[9]自制。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 利用湖泊沉积物-水界面采样装置,采取贵州阿哈湖湖水深21 cm处沉积物。立即于氮气手套箱中,按1 cm距离将柱芯沉积物分样,分样后迅速将样品带至实验室处理。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 40473050; 40173038)

作者简介: 王明义(1973-), 男, 主管检验师, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学

* 通讯作者(Correspondent author): 梁小兵, E-mail: liangxiaobing@vip.skleg.cn

作者单位: 1. 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵阳医学院生物化学与分子生物学教研室, 贵州 贵阳 550004

取沉积物柱芯7cm处样品,进行硫酸盐还原菌分离纯化培养。

1.2.2 硫酸盐还原菌分离纯化培养 接种适量沉积物于硫酸盐还原菌液体培养基中,32℃厌氧条件富集培养5d;取富集液接种于硫酸盐还原菌固体培养基,32℃厌氧条件分离培养3d;接种优势的黑色菌落于固体培养基,32℃厌氧条件纯化培养3d;接种纯化细菌菌落于液体培养基中,32℃厌氧条件液体增菌培养3d。

1.2.3 菌体染色及形态特征观察 参见文献[10]对纯化菌株分别进行革兰染色、鞭毛染色和芽孢染色。

1.2.4 DNA提取 采用酚-氯仿法对分离培养、纯化培养菌落

和液体增菌液,分别进行细菌DNA提取。

1.2.5 PCR扩增 应用依据硫酸盐还原菌6个类群16SrDNA保守区设计的6对特异性引物^[8](表1),分别进行硫酸盐还原菌6个类群的PCR扩增。PCR扩增均为30个循环,退火温度为52~58℃。每个反应体系中含10mmol/L Tris-HCl(pH 8.3),50mmol/L KCl,2.5mmol/L MgCl₂,2U Taq DNA聚合酶,0.4μmol/L上下游引物,0.2mmol/L dNTP,0.2μg DNA模板。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。每次PCR均设待扩增类群纯培养为阳性对照,大肠埃希菌(ATCC 8099)为阴性对照。

表1 硫酸盐还原菌类群16S rDNA靶位点PCR引物特异性序列
Table 1 16S rDNA-targeted PCR primer sequences specific for SRB subgroups

| 引物 Primer | 靶位点* Target site* | 序列(5'-3')** Sequence(5'-3')** | 特异性 Specificity | 产物片段长度 Length of product(bp) |
|--------------|----------------------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| DFM140 | 140 ± 158 | TAG MCY GGG ATA ACR SYK G | Group 1 | 700 |
| DFM842 | 842 ± 823 | ATA CCC SCW WCW CCT AGC AC | Group 2 | 1120 |
| DBB121 | 121 ± 142 | CGC GTA GAT AAC CTG TCY TCA TG | | |
| DBB1237 | 1237 ± 1215 | GTA GKA CGT GTG TAG CCC TGG TC | Group 3 | 840 |
| DBM169 | 169 ± 183 | CTA ATR CCG GAT RAA GTC AG | | |
| DBM1006 | 1006 ± 986 | ATT CTC ARG ATG TCA ACT CT | Group 4 | 1150 |
| DSB127 | 127 ± 148 | GAT AAT CTG CCT TCA AGC CTG G | | |
| DSB1273 | 1273 ± 1252 | CYY YYY GCR RAG TCG STG CCC T | Group 5 | 860 |
| DCC305 | 305 ± 327 | GAT CAG CCA CAC TGG RAC TGA CA | | |
| DCC1165 | 1165 ± 1144 | GGG GCA GTA TCT TYA GAG TYC | Group 6 | 610 |
| DSV230 | 230 ± 248 | GRG YCY GCG TYY CAT TAG C | | |
| DSV838 | 838 ± 818 | SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC | | |

[注] *: 16SrDNA positions; E. coli numbering; **: Ambiguities: R(G or A); Y(C or T); K(G or T); M(A or C); S(G or C); W(A or T)。

2 结果

2.1 分离、纯化培养和纯化菌株形态特征观察

样品富集后进行固体培养基分离培养,3d后培养基上出现大小不等的黑色菌落,即为不同类群硫酸盐还原菌菌落。对硫酸盐还原菌优势菌进行纯化培养后,得到中等大小、黑色、光滑的椭圆形菌落(图1);纯化菌株镜下形态为G⁺球菌,菌体呈卵圆形,多成对分布,单鞭毛,无芽孢,形态符合脱硫叶菌属(*Desulfobulbus*)^[11]。



左: 分离培养; 右: 纯化培养(Left: Isolation culture; Right: purification culture)

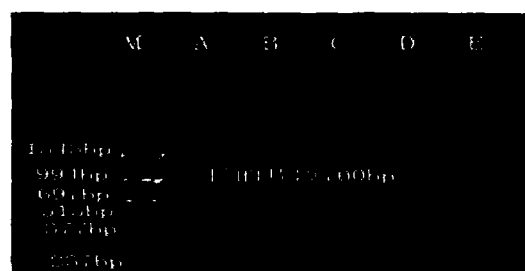
图1 分离培养和纯化培养硫酸盐还原菌菌落形态

Figure 1 Colony morphology of sulfate-reducing bacteria isolation and purification culture

2.2 PCR分析结果

分离培养DNA提取物分别经6个类群硫酸盐还原菌的

PCR扩增后,脱硫肠菌属、脱硫叶菌属和脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属均有特异性目的片段出现;纯化培养和液体增菌液DNA提取物的PCR,只有脱硫叶菌属有特异性目的片段出现;每次PCR阳性对照均有特异性目的片段,阴性对照为阴性扩增(图2~图4)。表明该层沉积物中有脱硫肠菌属、脱硫叶菌属和脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属;根据PCR扩增结果和纯化培养菌落特点、菌体染色及形态学特征将纯化菌株初步鉴定为脱硫叶菌属。



A: 分离培养; B: 纯化培养; C: 液体增菌液; D: 大肠埃希菌; E: 脱硫肠菌属; M: DNA Marker(A: Isolation culture; B: Purification culture; C: Liquid enrichment; D: E.coli; E: *Desulfotomaculum*; M: DNA Marker)

图2 脱硫肠菌属PCR扩增结果

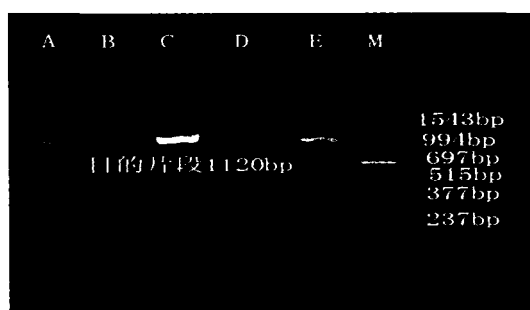
Figure 2 PCR products of *Desulfotomaculum*



A: 分离培养; B: 纯化培养; C: 液体增菌液; D: 大肠埃希菌; E: 脱硫叶菌属; M: DNA Marker (A: Isolation culture; B: Purification culture; C: Liquid enrichment; D: E.coli; E: *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*; M: DNA Marker)

图3 脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属PCR扩增结果

Figure 3 PCR products of *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*



A: 分离培养; B: 纯化培养; C: 液体增菌液; D: 大肠埃希菌; E: 脱硫叶菌属; M: DNA Marker (A: Isolation culture; B: Purification culture; C: Liquid enrichment; D: E.coli; E: *Desulfobulbus*; M: DNA Marker)

图4 脱硫叶菌属PCR扩增结果

Figure 4 PCR products of *Desulfobulbus*

3 讨论

依据硫酸盐还原菌 16SrDNA 构建的系统发生树, 将硫酸盐还原菌分为 6 个主要类群: 脱硫肠菌属 (*Desulfotomaculum*) (类群 1)、脱硫叶菌属 (*Desulfobubus*) (类群 2)、脱硫杆菌属 (*Desulfobacterium*) (类群 3)、脱硫细菌属 (*Desulfobacter*) (类群 4)、脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属 (*Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*) (类群 5) 和脱硫弧菌-脱硫微菌属 (*Desulfovibrio-Desulfomicrobium*) (类群 6)。国内部分实验室对硫酸盐还原菌类群分析鉴定, 仍采用建立在菌株的形态特征和生理生化特性基础上的传统学分类法^[4]。该法操作复杂且由于菌株变异, 使分析鉴定结果准确性和重复性较差, 同时由于要求培养条件的苛刻, 实验室获得其硫酸还原菌的纯化培养也较为困难。利用依据硫酸还原菌 16SrDNA 保守区设计的引物而进行的 PCR 扩增, 可以对硫酸盐还原菌类群进行准确分析^[8, 12], 但该类方法多采用直接从环境中提取 DNA, 使 DNA 提取物的纯度和完整性较差, 也不利于菌株的进一步分析研究。

我们优化了硫酸盐还原菌的分离纯化方法, 利用硫酸盐还原菌在分解硫酸盐的过程中产生高浓度的 H_2S 可以与 Fe^{2+} 作用

形成黑色 FeS 沉淀, 使其在选择性培养基上形成黑色菌落, 并获得硫酸盐还原菌的纯化培养。同时进一步利用 PCR 扩增对分离纯化的硫酸盐还原菌进行了类群分析鉴定。结果表明贵州阿哈湖沉积物 7 cm 处是硫酸盐还原菌较为活跃的沉积层, 该层沉积物有脱硫肠菌属、脱硫叶菌属和脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属的存在; 纯化的硫酸盐还原菌菌株初步鉴定为脱硫叶菌属, 菌体形态学特征亦支持该结论。利用分离培养和 PCR 技术对硫酸盐还原菌类群进行分析鉴定, 克服了传统学分类的操作复杂、结果不稳定性等缺点, 具有可靠、省时和操作简单等优势, 并有利于纯化菌株的进一步分析。

参考文献:

- [1] GILMOUR C C, HENRY E A. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition[J]. Environ Pollut, 1991, 71: 131-169.
- [2] EDWARDS E A, WILLS L E, REINHARD M, et al. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 794-800.
- [3] LOVLEY DR, PHILLIPS E J P. Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 850-856.
- [4] 穆军, 张肇铭. 硫酸盐还原细菌的分离纯化和鉴定[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2000, 23(1): 71-74.
- [5] DEVENDER K J. Evaluation of the semisolid Postgate's B medium for enumerating sulfate-reducing bacteria[J]. J Microbiol Methods, 1995, 22: 27-38.
- [6] MOSTAFA S E, JOHN M S, FARES Z, et al. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 5609-5621.
- [7] CATHERINE J, NIELS B R, KJELD I. Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfite reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 3314-3318.
- [8] KRISTIAN D, RICHARD J S, ALAN J M. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of Sulfate-Reducing Bacteria[J]. Microbiology, 2000, 146: 1693-1705.
- [9] 王雨春, 黄荣贵, 万国江. SW-1 型便携式湖泊沉积物-界面水取样器的研制[J]. 地质地球化学, 1998(1): 94-96.
- [10] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 26-46.
- [11] 马迪根 M T, 马丁克 J M, 帕克 J. 微生物生物学[M]. 杨文博, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 836-838.
- [12] 梁小兵, 朱建明, 刘丛强, 等. 贵州红枫湖沉积物有机质的酶及微生物降解[J]. 第四纪研究, 2003, 23(5): 565-572.

(收稿日期: 2005-11-29)

(英文编辑: 黄建权; 校对: 吴德才)